

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号: 20620091151300

UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

达托霉素分离纯化工艺研究

Study on the Separation and Purification of Daptomycin

张 萍

指导教师姓名: 卢英华 教授

专 业 名 称: 生 物 化 工

论文提交日期: 2 0 1 2 年 5 月

论文答辩日期: 2 0 1 2 年 6 月

学位授予日期: 2 0 1 2 年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2012 年 6 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（        ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于        年        月        日解密，解密后适用上述授权。

（        ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年        月        日

## 摘 要

达托霉素 (daptomycin) 是一种新型脂肽类抗生素, 具有在体外抗大多数的革兰氏阳性菌作用, 主要作用于耐药菌, 如耐万古霉素的肠球菌 (VRE)、耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌 (MRSA) 等。随着细菌耐药性的日趋严重, 达托霉素临床应用优势愈加显著。目前国内达托霉素的工业化受到生产成本的极大制约, 而在生产成本的构成中, 下游的分离纯化成本占有相当比例, 因此研究能够有效分离发酵液中达托霉素的方法具有重要意义。

本文首先对达托霉素在 HZ816 大孔吸附树脂上的吸附平衡特性进行了研究, 考察了 Langmuir 和 Freundlich 方程对等温吸附线的拟合, 并计算热力学参数, 结果表明: 在实验范围内, Freundlich 等温吸附方程能较好拟合实验数据, 吸附焓变  $\Delta H > 0$ , 吉布斯自由能  $\Delta G < 0$ , 吸附熵变  $\Delta S > 0$ , 表明该吸附过程为熵驱动的吸热、熵增的自发过程。

其次, 采用拟一级动力学模型和拟二级动力学模型描述了达托霉素在 HZ816 大孔吸附树脂上的吸附动力学特征, 采用动边界模型和均匀颗粒扩散模型确定吸附过程中的速度控制步骤。结果表明, 拟二级动力学模型能较好的模拟达托霉素在 HZ816 大孔吸附树脂上的吸附动力学行为, 吸附过程的速度控制步骤为颗粒扩散控制。

最后, 建立了从发酵液中提取达托霉素的工艺路线: 发酵液离心后, 再经过有机溶剂萃取, 大孔吸附, 离子交换层析后纯度由 3% 提高到 87.89%。对工艺参数进行了优化, 确定最佳操作条件为: 选择正丁醇为萃取剂, 发酵液 pH 4.5, 1/4 倍体积正丁醇连续萃取 3 次即可将 95% 以上的达托霉素萃取到有机相中, 再用 3 倍体积 pH 7.5 的 NaAc-HAc 缓冲液将达托霉素反萃取到水相中。选择 HZ816 大孔树脂为吸附介质, 反萃取液 pH 调至 4.5 以  $1 \text{ mL min}^{-1}$  的速度上样, 上样结束后, 先用 20% 异丙醇-NaAc-HAc 缓冲液溶液除去色素和极性较大的杂质, 再用 pH 6-8 的 60% 异丙醇-NaAc-HAc 缓冲液溶液以  $0.5 \text{ mL min}^{-1}$  的速度将达托霉素洗脱下来。选择 DEAE-Cellulose-52 作为离子交换介质, 柱长 40 cm, 浓缩溶液有利于在不影响纯度的前提下提高离子交换层析柱的处理量, 以

pH 7.0 NaAc-HAc 缓冲液为基础液, 300 mL 0.10-0.13 mol L<sup>-1</sup> NaCl 溶液在 0.5 mL min<sup>-1</sup> 的流速下线性洗脱。

**关键字：**达托霉素；纯化；萃取；大孔树脂吸附；离子交换层析

厦门大学博硕士论文摘要库

## Abstract

Daptomycin is a novel lipopeptide antibiotic which has in-vitro activity against gram-positive microorganisms, especially the antibiotic-resistant bacteria such as *Staphylococcus aureus* (MRSA), and *vancomycin-resistant enterococci* (VRE). As the drug-resistance of bacteria is increasingly serious, the advantages of clinical application of daptomycin are more remarkable. At present, the domestic production of daptomycin is greatly restricted by the high production cost, where downstream purification occupies a considerable proportion. Thus it has important significance to separate daptomycin from the fermentation broth.

In this study, the adsorption behaviors of HZ816 resin towards daptomycin in the aqueous solution were investigated. The equilibrium data were fitted by Langmuir model and Freundlich model under different temperatures, respectively, and the values of adsorption thermodynamic parameters were also obtained. The results showed that Freundlich isotherms were found to be the best model to fit the measured adsorption data. From the positive values of both  $\Delta H$  and  $\Delta S$  obtained, it is suggested an endothermic reaction and an increase in randomness at the solid-liquid interface during the adsorption of daptomycin onto the resin. Besides, the  $\Delta G$  values were all negative indicating it was a spontaneous adsorption process.

The pseudo first-order and pseudo second-order kinetic models were applied to describe the kinetics of adsorption process, and the homogeneous particle diffusion model and the shell progressive model were used to define the controlling mechanism of the overall adsorption process. The results show that the kinetic data are well described by the pseudo second-order kinetic model and particle diffusion was the rate-limiting step in the daptomycin adsorption process.

Finally, the purification and isolation process of daptomycin was determined. The fermentation broth were purified using centrifugation followed by organic solvent extraction, macroporous resin absorption and ion exchange chromatography.

Finally, the purity of daptomycin was increased from 3% to 87.89%. The technological parameters were also optimized as follow: The clarified fermentation broth was extracted with 20% n-butanol (v/v) at pH 4.5 for three times to achieve a recovery rate of more than 95%. Daptomycin was back-extraction from the butanol phase by addition of NaAc-HAc buffer (pH 7.5) with three volume of aqueous phase to butanol. The pH of aqueous daptomycin solution was then adjusted to 4.5 and allowed to pass through a column containing HZ816 resin at a flow rate of 1.0 mL min<sup>-1</sup>. The column was washed with 20% isopropyl alcohol-NaAc-HAc buffer to remove pigment and polar impurities, and daptomycin was eluted with 60% isopropyl alcohol-NaAc-HAc buffer (pH 6.0-8.0) at a flow rate of 0.5 mL min<sup>-1</sup>. The eluent was applied to DEAE-Cellulose-52, and the optimized column length was 40 cm. Higher concentration of eluent was beneficial to improve the handling capacity of chromatography column without influence on purity. The column was eluted with 300 mL of 0.10-0.12 mol L<sup>-1</sup> NaCl gradients of NaAc-HAc buffer in pH 7.0 at a flow rate of 0.5 mL min<sup>-1</sup>.

**Key words:** Daptomycin; Purification; Extraction; Macroporous resin adsorption; Ion exchange chromatography

## 目 录

<b>第一章 绪论 .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 达托霉素概述 .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 达托霉素结构和性质.....	3
1.1.2 达托霉素作用机理.....	4
1.1.3 达托霉素抗菌活性.....	5
1.1.4 达托霉素临床应用.....	5
<b>1.2 达托霉素生产概况 .....</b>	<b>7</b>
1.2.1 达托霉素生产菌株.....	8
1.2.2 达托霉素生物合成机理.....	8
<b>1.3 达托霉素分离纯化研究 .....</b>	<b>9</b>
1.3.1 达托霉素分离纯化进展.....	9
1.3.2 大孔吸附分离纯化抗生素的基本原理.....	10
1.3.3 大孔吸附平衡模型.....	11
1.3.4 大孔吸附动力学机理.....	12
1.3.5 吸附过程的动力学模型.....	13
1.3.6 离子交换层析分离纯化抗生素的基本原理.....	14
<b>1.4 达托霉素发展的前景 .....</b>	<b>16</b>
<b>1.5 本课题研究目的及内容 .....</b>	<b>17</b>
1.8.1 研究目的与意义.....	17
1.8.2 研究内容.....	17
<b>第二章 材料和方法 .....</b>	<b>18</b>
<b>2.1 实验仪器与药品 .....</b>	<b>18</b>
<b>2.2 实验方法 .....</b>	<b>18</b>
2.2.1 分析方法.....	18
2.2.2 大孔吸附树脂吸附达托霉素热力学研究.....	21
2.2.3 大孔吸附树脂吸附达托霉素动力学研究.....	22
2.2.4 发酵液来源及预处理.....	22
2.2.5 达托霉素发酵液有机溶剂萃取实验.....	23



2.2.6 大孔吸附树脂分离纯化达托霉素实验.....	24
2.2.7 离子交换层析分离纯化达托霉素实验.....	26
<b>第三章 大孔树脂吸附达托霉素的热力学和动力学研究.....</b>	<b>28</b>
3.1 大孔吸附热力学研究.....	28
3.1.1 大孔吸附树脂的筛选.....	28
3.1.2 温度对吸附等温线的影响.....	30
3.1.3 吸附等温线的模型拟合.....	30
3.1.4 吸附热力学参数.....	31
3.2 大孔吸附动力学研究.....	33
3.2.1 吸附动力学模型拟合.....	33
3.2.2 吸附过程速率控制步骤的确定.....	35
3.2.3 浓度对吸附速率的影响.....	38
3.3 本章小结.....	38
<b>第四章 达托霉素分离纯化工艺研究.....</b>	<b>40</b>
4.1 达托霉素发酵液有机溶剂萃取.....	40
4.1.1 萃取剂的选择.....	40
4.1.2 萃取 pH 的选择.....	41
4.1.3 萃取相比的选择.....	42
4.1.4 萃取次数的选择.....	43
4.1.5 反萃取水相 pH 的选择.....	44
4.1.6 反萃取相比的选择.....	44
4.1.7 有机溶剂萃取脱色效果分析.....	45
4.2 大孔吸附分离纯化达托霉素.....	47
4.2.1 大孔吸附树脂的筛选.....	47
4.2.2 pH 对树脂静态吸附的影响.....	48
4.2.3 达托霉素浓度对树脂静态吸附的影响.....	49
4.2.4 洗脱剂 pH 对静态解吸的影响.....	50
4.2.5 异丙醇浓度对静态解吸的影响.....	51
4.2.6 流速对达托霉素动态吸附的影响.....	52
4.2.7 异丙醇浓度对达托霉素动态洗脱的影响.....	52
4.2.8 洗脱速度对达托霉素动态洗脱的影响.....	54

<b>4.3 离子交换层析分离纯化达托霉素</b>	<b>54</b>
4.3.1 离子交换层析介质的选择	54
4.3.2 pH 对达托霉素动态吸附的影响	56
4.3.3 洗脱流速对达托霉素动态洗脱的影响	56
4.3.4 上样量对达托霉素动态洗脱的影响	57
4.3.5 离子强度梯度对达托霉素动态洗脱的影响	58
<b>4.4 本章小结</b>	<b>59</b>
<b>第五章 结论与展望</b>	<b>60</b>
5.1 结论	60
5.2 存在问题及展望	61
<b>参考文献</b>	<b>62</b>
<b>附 录</b>	<b>69</b>
<b>在读期间发表论文</b>	<b>75</b>
<b>致谢</b>	<b>76</b>

# CONTENTS

<b>Chapter 1 Introduction .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Introduction of daptomycin.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Structure and characteristics of daptomycin .....	3
1.1.2 Antimicrobial mechanism of daptomycin .....	4
1.1.3 Antimicrobial activity of daptomycin .....	5
1.1.4 Clinical applications of daptomycin .....	5
<b>1.2 Introduction of daptomycin production.....</b>	<b>7</b>
1.2.1 Production strain .....	8
1.2.2 Biosynthesis mechanism of daptomycin .....	8
<b>1.3 Isolation and purification of daptomycin .....</b>	<b>9</b>
1.3.1 Research progress of isolation and purification of daptomycin.....	9
1.3.2 The basic principle of antibiotic separation by macroporous resin .....	10
1.3.3 Equilibrium models of macroporous adsorption.....	11
1.3.4 Kinetics mechanism of macroporous adsorption .....	12
1.3.5 Kinetics methods of macroporous adsorption process.....	13
1.3.6 The basic principle of antibiotic separation by ion exchange chromatography .....	14
<b>1.4 Prospect of daptomycin.....</b>	<b>15</b>
<b>1.5 Purpose and contents of the study .....</b>	<b>17</b>
1.5.1 Purpose of the study .....	17
1.5.2 Contents of the study .....	17
<b>Chapter 2 Materials and methods.....</b>	<b>18</b>
<b>2.1 Instruments and reagents .....</b>	<b>18</b>
<b>2.2 Experimental methods .....</b>	<b>18</b>
2.2.1 Analytical methods.....	18
2.2.2 Adsorption thermodynamics of daptomycin by macroporous resin .....	21
2.2.3 Adsorption kinetics of daptomycin by macroporous adsorption resin .....	22
2.2.4 Source and pretreatment of daptomycin fermentation broth .....	22

2.2.5 Extraction of daptomycin by organic solvent extraction .....	23
2.2.6 Adsorption of daptomycin by macroporous resin .....	24
2.2.7 Isolation and purification of daptomycin by ion exchange chromatography .....	26
<b>Chapter 3 Adsorption thermodynamics and kinetics of daptomycin on macroporous resin .....</b>	<b>28</b>
<b>3.1 Study of adsorption thermodynamics.....</b>	<b>28</b>
3.1.1 Screening of resins .....	28
3.1.2 Effect of temperature on adsorption isotherms .....	30
3.1.3 Simulation of adsorption isotherms .....	30
3.1.4 Adsorption thermodynamics parameters.....	31
<b>3.2 Study of adsorption kinetics.....</b>	<b>33</b>
3.2.1 Model of adsorption kinetics .....	33
3.2.2 Estimation of the controlling step of the adsorption process .....	35
3.2.3 Effect of daptomycin concentration on the adsorption process .....	38
<b>3.3 Conclusions .....</b>	<b>38</b>
<b>Chapter 4 Separation and purification of daptomycin .....</b>	<b>40</b>
<b>4.1 Extraction of daptomycin from fermentation broth .....</b>	<b>40</b>
4.1.1 Selection of extractant.....	40
4.1.2 Selection of extraction pH .....	41
4.1.3 Selection of extraction phase ratio .....	42
4.1.4 Selection of extraction batches .....	43
4.1.5 Selection of back extraction pH.....	44
4.1.6 Selection of back extraction phase ratio .....	44
4.1.7 Analysis of decoloration results by organic solvent extraction.....	45
<b>4.2 Purification of daptomycin by macroporous adsorption resin .....</b>	<b>47</b>
4.2.1 Screening of resins .....	47
4.2.2 Effect of pH on the static adsorption .....	48
4.2.3 Effect of daptomycin concentration on the static adsorption.....	49
4.2.4 Effect of eluant pH on the static desorption.....	50
4.2.5 Effect of isopropanol concentration on the static desorption.....	51

4.2.6 Effect of flow rate on the dynamic adsorption.....	52
4.2.7 Effect of isopropanol concentration on the dynamic elution .....	52
4.2.8 Effect of elution rate on the dynamic elution.....	54
<b>4.3 Purification of daptomycin by ion exchange chromatography .....</b>	<b>54</b>
4.2.1 Screening of ion exchange medium .....	54
4.2.2 Effect of pH on the dynamic adsorption .....	56
4.2.3 Effect of elution rate on the dynamic elution.....	56
4.2.4 Effect of sample volume on the dynamic elution .....	57
4.2.5 Effect of ionic strength gradient on the dynamic elution.....	58
<b>4.4 Conclusions .....</b>	<b>59</b>
<b>Chapter 5 Conclusions and prospects.....</b>	<b>60</b>
5.1 Conclusions .....	60
5.2 Problems and prospects .....	61
<b>References .....</b>	<b>62</b>
<b>Appendix .....</b>	<b>69</b>
<b>Publications .....</b>	<b>75</b>
<b>Acknowledgements .....</b>	<b>76</b>

## 第一章 绪论

二十世纪生物医药领域获得巨大成功，人类在疾病的预防、治疗上出现突破性进展，过去许多人们谈之色变的疾病得到了有效的控制和治疗。人们在了解疾病的致病机理后，开始有针对性、系统地进行药物研发，期待开发出专一性、低毒、高效的治疗药物。抗生素作为一类重要的医药产品，随着新的抗生素不断被发现和应用，许多传染性疾病，甚至癌症都得到了有效的控制和治疗，消灭了许多过去夺去无数人生命的可怕瘟疫。但是，这种局面由于耐药菌的出现而改变，目前医院里死亡的许多病人仍是由于细菌感染造成的，这些细菌当中的大多数已经属于耐药菌，而不再是普通的细菌<sup>[1]</sup>。随着高致病耐药菌，如耐甲氧西林金葡菌（MRSA）、耐万古霉素肠球菌（VRE）和耐青霉素肺炎链球菌（PRSP）等的不断出现，临床上对抗耐药菌新型抗生素的需求变得十分迫切。

而被认为是防御许多严重革兰氏阳性菌感染最后防线的万古霉素，现在某些细菌对其也有高耐药率<sup>[2]</sup>。细菌耐药性已成为 21 世纪全球关注的热点，它对人类生命健康所构成的威胁绝不亚于艾滋病、癌症和心血管疾病，因此对抗耐药病原菌新药物的研究开发成为近年来的热门课题<sup>[3]</sup>。

为了应对这种情况，对革兰氏阳性微生物耐药株有更好毒性谱和较低耐药性发展潜力的新型抗生素无疑正是临床迫切需求的。开发新型高效的新一代抗生素具有重大的意义。

### 1.1 达托霉素概述

达托霉素（daptomycin）是由玫瑰孢链霉菌发酵（*Streptomyces roseosporus*）产生的一种由一个十碳烷侧链与一个由 13 个氨基酸残基组成的环状 $\beta$ -氨基酸肽链 N-末端的色氨酸连接而成的酸性脂肽类抗生素，该菌种最早由 Falcao de Morias 和 Dailia Maia 在 1961 年从土耳其 Ararat 山土样中分离筛选得到。玫瑰孢链霉菌在琼脂—葡萄糖平板培养基上产生表面光滑的灰白色孢子，同时可产生红色及浅棕色水溶性色素<sup>[4, 5]</sup>。80 年代美国 Lilly 公司研究人员发现达托霉素并制成静脉针剂用于治疗革兰氏阳性菌感染。在 80 年代和 90 年代早期，进行了 I 期

和 II 期试验，参与人员超过 370 名。试验发现达托霉素对皮肤和软组织感染，以及菌血症具有显著效果<sup>[2]</sup>。

1997 年，美国 Cubist 公司从 Lilly 公司取得达托霉素的专利权，并分别在菌血症和复杂的皮肤和软组织感染中进行了 I 期和 II 期临床试验。为了满足病人对新型耐药抗生素的迫切需求，2003 年底，美国食品与药物管理局（FDA）经过快速审理程序批准注射用达托霉素（商品名 cubicin），用于治疗由一些革兰氏阳性敏感菌株引起的并发性皮肤及皮肤结构感染，如脓肿、手术切口感染和皮肤溃疡。美国食品药品监督管理局（FDA）经优先审批程序批准了美国库比司特（Cubist）制药公司的达托霉素（Daptomycin/Cubicin）的一项补充新药申请，即 1 日 1 次静脉内给药治疗金黄色葡萄球菌血液感染，包括由对甲氧西林敏感和耐药金黄色葡萄球菌引起的右侧心内膜炎。达托霉素是现在在美获准治疗上述适应症的惟一静脉内给药用抗生素。通过静脉注射，达托霉素产生的药代动力学为线性，半衰期为八小时。在各种动物模型中，达托霉素对药物敏感与耐药性革兰氏阳性菌均有效力。正在进行的第二阶段研究，在每天给药一次的基础上研究达托霉素对革兰氏阳性菌引起的严重感染的药效，包括皮肤和软组织感染，群落获得性肺炎和 VRE 感染，其副作用小，安全性高<sup>[6]</sup>。在体外，达托霉素的抗菌活性包括了绝大多数的临床革兰氏阳性菌，它对革兰氏阴性菌无作用。对 70 种临床分离的菌株，达托霉素在与 25 种抗生素试验中的相互作用是相加或无关的，没有发现拮抗作用，协同作用最常见于与氨基糖苷类抗生素合用及在肠球菌的治疗中<sup>[7]</sup>。

2006 年 1 月 Chiron 公司宣布，欧盟委员会批准其达托霉素在挪威、冰岛、列支敦斯登及欧盟 25 个成员国上市，其适应证为革兰阳性菌引起的皮肤及软组织并发感染。2006 年 5 月 Cubist 公司宣布，美国 FDA 批准达托霉素用于治疗金黄色葡萄球菌引起的血液感染和右侧心内膜炎<sup>[8]</sup>。而在 2009 年 9 月中国国家食品药品监督管理局（SFDA）批准了 Cubicin 用于治疗金黄色葡萄球菌（包括超级细菌-耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌）导致的伴发右侧感染性心内膜炎的血流感染。阿斯利康将在中国上市全新的环脂肽类抗生素-克必信（达托霉素），Cubicin 将在美国生产，并在中国（无锡）进行分包装。该产品于 2010 年在中国正式上市<sup>[9]</sup>。

### 1.1.1 达托霉素结构和性质

达托霉素的化学名为 N-癸酰-L-色氨酸-L-天冬酰胺酰-L-天冬氨酸-L-苏氨酸甘氨酸-L-鸟氨酸-L-天冬氨酸-D-丙氨酸-L-天冬氨酸甘氨酸-D-丝氨酸-threo-3-甲基-L-谷氨酸-3-丙氨酸 $\epsilon$ 1-内酯，表观分子式为  $C_{72}H_{101}N_{17}O_{26}$ ，分子量 1620.67，化学结构式如图 1.1 所示。其分子结构由一个十碳烷侧链与一个环状  $\beta$  氨基酸肽链 N-末端的色氨酸连接而成，如图 1.2 所示，这个环状的  $\beta$  氨基酸肽链也称为母核化合物 A21978C<sup>[10]</sup>。

达托霉素易溶于水，在碱性和 pH 大于 3.5 的酸性溶液中可以大量溶解；易溶于小分子有机溶剂如甲醇、乙醇、异丙醇、丁醇等；微溶于丙酮、氯仿。达托霉素的盐易溶于水和甲醇，但不溶于乙醇和丁醇。达托霉素在水溶液中极稳定，室温下能保存 7 天以上；当 pH 小于 2 或大于 9 时，达托霉素容易变性，当 pH 大于 11 时，达托霉素在 4 小时内即可完全变性，以上变性均不可逆<sup>[11]</sup>。

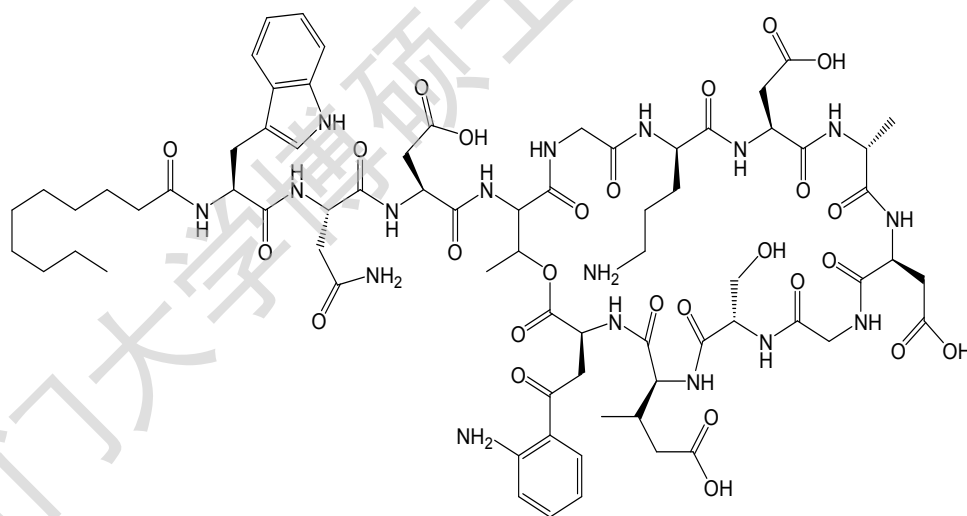


图 1.1 达托霉素化学结构式

Fig. 1.1 Chemical structure of daptomycin

达托霉素的分子结构中既含有亲水性氨基酸，又含有脂链以及疏水性氨基酸，这就决定了其两亲性的生物学特性。达托霉素为酸性抗生素，在中性 pH 下分子带负电荷，因而具有很好的水溶性。同时，脂链和疏水性基团的存在，使达托霉素具有很好的脂溶性。达托霉素两亲性的物化性质，决定了其良好的抗菌效



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库